



## Biokatalysatorens vej til industrien

Krühne, Ulrich; Heintz, Søren; Pereira Rosinha, Ines; Ringborg, Rolf Hoffmeyer; Tufvesson, Pär; Gernaey, Krist; Woodley, John

*Published in:*  
Dansk Kemi

*Publication date:*  
2013

*Document Version*  
Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link back to DTU Orbit](#)

*Citation (APA):*  
Krühne, U., Heintz, S., Pereira Rosinha, I., Ringborg, R. H., Tufvesson, P., Gernaey, K., & Woodley, J. (2013). Biokatalysatorens vej til industrien. *Dansk Kemi*, 94(11), 18-22.

---

### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

# Biokatalysatorers vej til industrien

Miniature-enhedsoperationer giver nye muligheder, som potentielt kan accelerere udviklingen af nye processer, såsom processer baseret på biokatalyse.

Af Ulrich Krühne, Søren Heintz, Inês P. Rosinha, Rolf H. Ringborg, Pär Tufvesson, Krist V. Gernaey, John M. Woodley, DTU KemiTeknik

Biokatalyse dækker over brugen af enzymer til at katalysere kemiske reaktioner i forbindelse med industriel produktion. Processer baseret på biokatalyse anses tit som grønnere, mere selektive og i nogle tilfælde billigere end deres kemiske modparter, hvilket også forklarer den industrielle interesse. Der er på nuværende tidspunkt omkring 200 kommercielle processer i industrien, der er baseret på biokatalyse. Størstedelen af disse processer findes i den farmaceutiske sektor [1]. Farmaceutiske molekyler får i mange tilfælde deres funktionalitet fra amino-grupper, og synteseveje til at opnå optisk rene chirale aminer er specielt interessante. Da det oftest er nødvendigt kun at fremstille én specifik chiral form af molekylet, er det nødvendigt med metoder, hvorpå dette kan opnås. Det kan f.eks. foretages ved selektiv krystallisering eller kemisk baseret katalyse.

uden kan produkter og substrater have en inhiberende effekt på enzymet, og ofte har disse også lave vandige opløseligheder. Ved første øjekast er disse processer ikke profitable og ligger langt fra de industrielle krav. Sådanne processer kan dog gøres økonomisk favorable ved en kombination af proteinmodificering og forskellige reaktions-, reaktor- og procesingeniørmæssige værktøjer, f.eks. *in situ* produktfjernelsesmetoder eller lignende. I faktaboks 1, side 20, er der givet et kort overblik over de generelle problemer med  $\omega$ -transaminaser og nogle alment benyttede teknikker til at forbedre ydeevnen af disse processer [2,3]. Figur 1 giver et overblik over sammenhæng og formålet ved brugen af de forskellige teknikker.

## BIOINTENSE-projektet

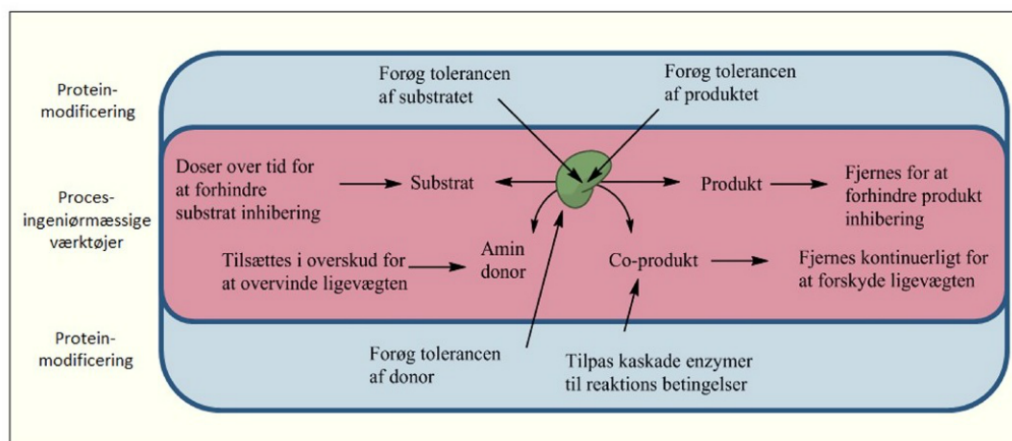
I den farmaceutiske industri er tiden, det tager at udvikle patenterede processer, kritisk og derfor er det essentielt at kunne screene og evaluere forskellige procesmuligheder hurtigt og pålideligt.

Dette er det centrale koncept bag et nyt EC-projekt, BIOINTENSE, ledet af en gruppe ved

Institut for Kemiteknik på DTU.

Projektet er baseret på at udvikle miniature-enhedsoperationer, som kan øge procesudviklingen gennem parallelisering og automatik. Ydermere er det intentionen at benytte forskellige modelanalyseværktøjer, f.eks. CFD – "Computational Fluid Dynamics", til at udnytte eksperimentelle resultater bedre, opnå bedre procesforståelse og hjælpe med at udvælge processer med størst industrielt potentiale.

Her fokuseres på fordele og udfordringer relateret til brugen af mikrosystemer samt de generelle mål for BIOINTENSE-projektet.



Figur 1. Overblik over forskellige strategier, der benyttes til at forbedre biokatalytiske processer, så de potentielt bliver økonomisk favorable. Proteinmodificering benyttes til at ændre enzymerne, så de bliver mere hårdføre overfor industrielle procesforhold. Procesingeniørmæssige værktøjer benyttes til at forskyde reaktionsligevægten mod produktsiden og mindske inhiberende effekter.

Biokatalysatorer er specielt interessante i denne sammenhæng grundet deres generelt gode selektivitet.

Der er principielt flere alternativer, hvor forskellige biokatalysatorer kan benyttes til fremstilling af chirale molekyler. Specielt  $\omega$ -transaminase enzymer har været flittigt undersøgt for at finde S- og i nogle tilfælde R-selektive varianter, samt effektive måder at køre sådanne processer på, med det formål at opnå industriel implementering. På trods af at  $\omega$ -transaminaser har god selektivitet og unikke evner til at danne chirale centre, i teorien med 100% udbytte, så er disse processer meget svære at implementere industrielt. Det skyldes bl.a., at reaktionsligevægten i mange tilfælde er forskudt mod substratsiden. Des-

## Miniature-enhedsoperationer til procesudvikling

### Fordele

Miniature-enhedsoperationer refererer til håndteringen af væsker i små kanaler ( $\mu$ L skala), også kaldet mikrosystemer. Et eksempel på et mikrosystem-design kan ses i figur 2. I denne størrelsesorden er effekter som overfladespænding og væskefilmmodstand dominerende. Disse dominerende effekter gør det muligt at udvikle og udføre processer på nye måder.

• I denne lille skala opnår man stor kontrol over temperaturen grundet et øget størrelsesforhold mellem overfladeareal og væskevolumen.



## Faktaboks 1: $\omega$ -transaminase-teknologi

$\omega$ -transaminaser er en gruppe af enzymer, der kan syntetisere eller spalte chirale aminer. Spaltningen af chirale aminer er pr. definition begrænset til 50% udbytte, mens asymmetrisk syntese af aminer teoretisk set kan give udbytter på 100%. I BIOINTENSE-projektet fokuseres der på asymmetrisk syntese, som overordnet har 3 udfordringer:

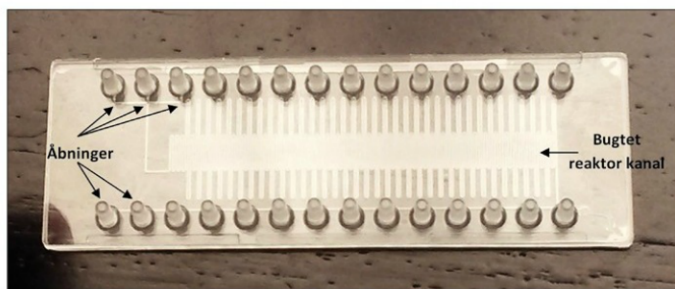
- Lav opløselighed af substrater og produkter i vandige faser
- Substrater og produkter har i mange tilfælde inhiberende effekter på enzymet
- Reaktionsligevægten er i mange tilfælde forskudt mod substratsiden

$\omega$ -transaminaser kan benyttes som isolerede enzymer, immobiliserede enzymer eller i form af hele celler. Følgende ingeniørmæssige værktøjer benyttes til at mindske effekten af udfordringerne relateret til  $\omega$ -transaminase-applikationer:

- Tofasede processer
- *In situ* produktfjernelse
- Kontrolleret substrattilførsel
- *In situ* biproduktfjernelse
- Justering af tilførselsforholdet mellem substrater

Yderligere information om  $\omega$ -transaminase-teknologier kan findes i Tufvesson *et al.* [3].

- Brugen af mikrosystemer har generelt mest været relateret til applikationer i kemisk syntese, f.eks. hvor det har været nødvendigt at kontrollere svære synteser med ustabile reaktionskomponenter samt have systemer med øget sikkerhed og kontrol for hurtige reaktioner. Interessen for at bruge mikrosystemer i sammenhæng med biokatalyse er dog stigende, grundet potentialet for at opnå reducerede omkostninger og udforske nye procesmuligheder. I den videnskabelige litteratur er der givet mange eksempler og argumenter, der indikerer potentialet og fordelene ved at benytte mikrosystemer (faktaboks 2) [4].



Figur 2. Eksempel på et mikrosystem, der f.eks. kan benyttes som reaktor, til ekstrahering eller lignende. Det viste mikrosystem har flere åbninger i begge ender af kanalen, som gør det muligt at have flere strømme ved siden af hinanden samt at opnå efterfølgende separering af strømmene.

- Generelt benyttes mikrosystemer hovedsageligt til procesudvikling og i nogle tilfælde til produktion. Procesudvikling er relateret til at teste og optimere forskellige procesmuligheder, f.eks. forskellige biokatalysatorer, reaktorkombinationer og oprensningmuligheder. Det vil herudover være muligt at opnå indblik i fulde proces-systemer ved kombination af de mest lovende enhedsoperationer. Fordelen ved at gøre dette i mikroskala er at omkostningerne til procesudvikling typisk er reduceret pga. mindsket ressourceforbrug.

- Efter identificering af de mest lovende kombinationer af enhedsoperationer er næste skridt at forøge produktiviteten, så efterspørgslen af det givne produkt kan dækkes. Er efterspørgslen høj vil det være nødvendigt enten at forøge produktiviteten ved opskalering (gradvis forøgelse af systemdimensioner -  $\mu\text{L} \rightarrow \text{mL} \rightarrow \text{L} \rightarrow \text{m}^3$ ) eller alternativt ved at parallelisere enkeltssystemer. Opskaleringen har sine begrænsninger grundet skiftende dominante kræfter som følge af stigende procesvolumener. Parallelisering burde principielt være lige til, eftersom procesplatformen allerede er udviklet og optimeret, men det er i realiteten vanskeligt, da der kan opstå problemer med at kontrollere og evaluere mange parallelle mikrosystemer. Omkostningerne til produktionen af mikrosystemer er også relativt høje, så det vil kræve en væsentlig reducere for større udbredelse af disse systemer opnås.

De ovennævnte strategier for procesudvikling og opskalering er illustreret i figur 3, side 22. På denne figur er der ligeledes lavet en sammenligning med den konventionelle metode. Det skal dog nævnes, at individuelle reaktioner drager forskellige fordele af at blive udført i mikrosystemer, og i visse tilfælde giver det ikke mening at benytte mikrosystemer [5]. Nogle begrænsninger for mikrosystemer diskuteres i næste sektion.

## Faktaboks 2: Fordele ved brugen af mikrosystemer

I den videnskabelige litteratur er der mange eksempler på fordele ved brugen af mikrosystemer. Nogle af de fordele er:

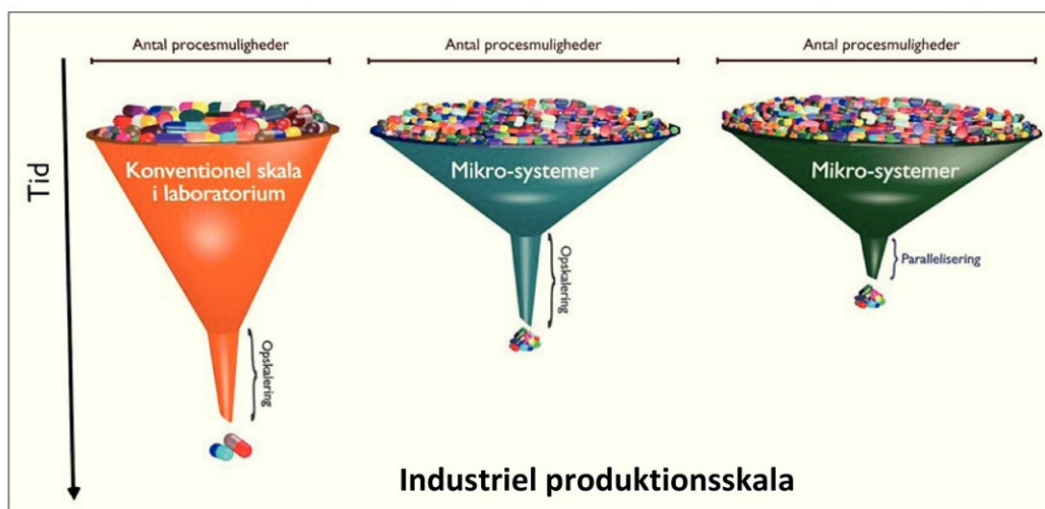
- Små volumener mindsker forbruget af svært tilgængelige og dyre ressourcer, f.eks. enzymer
- Forbedret sikkerhed i tilfælde af ulykker pga. den lave mængde kemikalier til stede i en mikroreaktor
- Hurtig masse- og varmetransport, som en konsekvens af en stor overflade til væskevolumen-forhold
- Laminar væskestrømning giver udelukkende blanding ved diffusion og gør det nemmere at opstille modeller, der beskriver systemerne, f.eks. vha. Computational Fluid Dynamics (CFD)
- Modulære enhedsprocesser i mikroskala gør det nemt at teste forskellige procesmuligheder, samt at kombinere dem

## Udfordringer

På trods af at mikrosystemer har et stort potentiale, er der visse udfordringer, der skal overkommes, før denne teknologi opnår sit fulde potentiale. Nogle af de generelle udfordringer relateret til applikation af mikrosystemer er:

- Manuel prøvehåndtering giver store fejlkilder og usikkerheder, grundet de små volumener der arbejdes med. Implementering af online målemetoder er nødvendig for at reducere disse fejlkilder. Samtidig gør sådanne målemetoder det muligt at automatisere platformene. Det kan dog være et problem at implementere almindelige online målemetoder, f.eks. NIR, pga. pladsproblemer.
- Faste partikler i mikrosystemer forårsager i langt de fleste tilfælde tilstopning af kanalerne efter kort tids drift [6]. For biokatalytiske processer er dette et stort problem grundet varieret formulering af biokatalysatorer, f.eks. som isolerede enzymer, immobiliseret på overflader, i partikler eller som hele celler. Generelt er det økonomisk fordelagtigt at kunne bruge enzymerne i så uren form som muligt, pga. mindskede oprensningsomkostninger [7].
- Integrering af udstyr på mikrosystemerne, f.eks. pumper, ventiler, måleinstrumenter eller varme/køle-regioner, kan være ret udfordrende grundet manglende plads.





Figur 3. De tre fragte repræsenterer forskellige metoder til at udvikle biokatalytiske processer samt den relative tid udviklingen tager. Pillerne i hver fragt repræsenterer forskellige procesmuligheder. Forskellen mellem metoderne er relateret til de enhedsoperationer, der benyttes, og hvilket substrat, produkt eller enzym der undersøges. Den orange fragt repræsenterer procesudvikling og screening i konventionel skala i laboratorium, med tilhørende opskalering til industriel produktionsskala. Den blå og grønne fragt repræsenterer alternativ accelereret procesudvikling og screening i mikrosystemer, med efterfølgende opskalering eller parallelisering for at øge til industriel produktionsskala. Det vil være muligt at teste flere processer i mikrosystemer som en konsekvens af mindsket ressourceforbrug og at gøre det hurtigere i automatiserede "lab-on-a-chip"-systemer.

## Freemtsudsigter

Målet med BIOINTENSE-projektet er at udnytte miniature-enhedsoperationer til at accelerere procesudviklingen af  $\omega$ -transaminase processer. Yderligere information om BIOINTENSE kan findes på projektets hjemmeside ([www.biointense.nu](http://www.biointense.nu)). På nuværende tidspunkt er det svært at forudsige, hvilke resultater BIOINTENSE-projektet opnår, og hvor god virkningsgrad mikrosystemerne kommer til at have. Indledende

ustabile reaktionskomponenter, hvilket ikke er muligt i konventionelle udviklingsplatforme. De involverede industrielle og akademiske partnere er listet i faktaboks 3.

**BIOINTENSE-projektet – Mastering Bioprocess integration and intensification across scales (Bevillingsaftale nummer: 312148) – er finansieret fra EU FP7-programmet.**

## E-mail

Ulrich Krühne: [ulkr@kt.dtu.dk](mailto:ulkr@kt.dtu.dk)  
Søren Heintz: [shein@kt.dtu.dk](mailto:shein@kt.dtu.dk)  
Inês P. Rosinha: [inros@kt.dtu.dk](mailto:inros@kt.dtu.dk)  
Rolf H. Ringborg: [rolri@kt.dtu.dk](mailto:rolri@kt.dtu.dk)  
Pär Tufvesson: [pt@kt.dtu.dk](mailto:pt@kt.dtu.dk)  
Krist V. Gernaey: [kvg@kt.dtu.dk](mailto:kvg@kt.dtu.dk)  
John M. Woodley: [jw@kt.dtu.dk](mailto:jw@kt.dtu.dk)

## Referencer:

1. D. J. Pollard, J. M. Woodley; Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now, *Trends in biotechnology*, 2007, 25, 66-73.
2. J. Ward, R. Wohlgemuth; High-yield biocatalytic amination reactions in organic synthesis, *Current Organic Chemistry*, 2010, 14, 1914-1927.
3. P. Tufvesson, J. Lima-Ramos, J. S. Jensen, N. Al-Haque, W. Neto, J. M. Woodley; Process Considerations for the Asymmetric Synthesis of Chiral Amines Using Transaminase, *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, 108, 1479-1493.
4. R. L. Hartman, K. F. Jensen; Mikrochemical systems for continuous-flow synthesis, *Lab-on-a-Chip*, 2009, 9, 2495-2507.
5. D. M. Roberge, L. Ducry, N. Bieler, P. Cretton, B. Zimmermann; Mikro-reactor technology: A revolution for the fine chemical and pharmaceutical industries?, *Chemical Engineering and Technology*, 2005, 28, 318-323.
6. R. L. Hartman; Managing Solids in Mikroreactors for the Upstream Continuous Processing of Fine Chemicals, *Organic Process Research and Development*, 2012, 16, 870-887.
7. P. Tufvesson, J. Lima-Ramos, M. Nordblad, J. M. Woodley; Guidelines and Cost Analysis for Catalyst Production in Biocatalytic Processes, *Organic Process Research and Development*, 2011, 15, 255-274.
8. V. K. Bodla, R. Seerup, U. Krühne, J. M. Woodley, K. V. Gernaey; Mikroreactors and CFD as tools for biocatalysis reactor design: A case study, *Chemical Engineering and Technology*, 2013, 36, 1017-1026.

## Faktaboks 3: Industrielle og akademiske partnere i BIOINTENSE-projektet

### Akademiske partnere

- Danmarks Tekniske Universitet (koordinator) (DK)
- Det Tekniske Universitet i Graz (AUT)
- Universitetet i Ljubljana (SVN)
- Universitetet i Gent (BEL)
- Universitetet i Manchester (ENG)
- Universitetet i Lund (SWE)

### Industrielle partnere

- Sigma-Aldrich Production GmbH (SUI)
- DSM Innovative Synthesis BV (NED)
- VITO (BEL)
- Mikrofluidic ChipShop GmbH (GER)
- iX-factory GmbH (GER)
- Lentikat's a.s. (CZE)
- c-LEcta GmbH (GER)
- Luxcel (IRL)

resultater er dog positive og i visse tilfælde meget overraskende, hvilket er meget lovende mht. hvor meget dette projekt rent faktisk forventes at opnå. Mikrosystemerne forventes at kunne bidrage til at opnå effektiv screening af procesforhold og derigennem opnå forbedret adgang til essentielle procesparametre. Ydermere kan mikrosystemerne benyttes til at udvide forståelsen af og viden om andre vigtige materiale transportparametre, såsom diffusionshastigheder af substrater og produkter [8],

samt bedre forståelse for komplekse interaktioner i biokatalytiske systemer.

Et andet motiverende aspekt er de entusiastiske og engagerede industrielle partnere, såvel som vores andre akademiske partnere, som alle er overbeviste om nødvendigheden af at udvikle miniatureværktøjer, der kan hjælpe med at undersøge og screene forskellige procesmuligheder. Det forventes potentielt at accelerere udviklingen af nye processer og reducere udviklingsomkostninger, hvilket vi også vil forsøge at påvise under projektets levetid. En anden vigtig motivationsfaktor er muligheden for at have automatisk kontrol af systemerne samt bedre proceskontrol. Den forbedrede proceskontrol vil gøre det muligt at screene og producere